

B18

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

B18

(10) 中华人民共和国专利局

(11) 公开号 CN 1074243A



# (12) 发明专利申请公开说明书

(21) 申请号 93100115.3

(51) Int.Cl<sup>5</sup>

C12P 21/02

(43) 公开日 1993年7月14日

(22) 申请日 93.2.6  
(71) 申请人 北京中化生物技术研究所  
地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号  
(72) 发明人 赵春华 唐佩弦 王喜玺

(74) 专利代理机构 北京师范学院专利事务所  
代理人 林 强

C12N 15/64 C12N 15/66  
C12N 15/70 A61K 37/42

THE BRITISH LIBRARY  
17 SEP 1993  
SCIENCE REFERENCE AND  
INFORMATION SERVICE

说明书页数: 5 附图页数: 3

(54) 发明名称 白介素 6-白介素 2 融合蛋白及其制法和用途

## (57) 摘要

本发明公开了一种具有抗癌性能白介素 6 活性及白介素 2 活性的融合蛋白, 通过优化转译起始序列, 合成 IL6、IL2 功能区上、下游引物及中间接头一对寡核苷酸, 将天然终止密码子 TAG 换成大肠杆菌偏性密码子 TAA, PCR 扩增获得 IL-6、中间接头、IL-2 基因片段, 经酶切、连接重组至表达载体 PBV220, 诱导高效表达, 分离包涵体, 变性、复性获得具有 IL2、IL6 双活性融合蛋白。它较 IL6、IL2 单因子或双因子联合在多领域的研究有更多的生物学效应。

△  
V02

(BJ) 第 1456 号

# 权 利 要 求 书

1、一种白介素6—白介素2的融合蛋白，其特征在于是由白介素6—中间接头—白介素2多肽序列组成，分子量为36—38KD。

2、根据权利要求1所述的融合蛋白，其特征在于所述中间接头序列的长度为15—456PDA。

3、根据权利要求1和2的融合蛋白，其特征在于所述的中间接头是由天门冬酰胺、丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、丙氨酸所组成。

4、根据权利要求1的融合蛋白，其特征在于含有图1CNA序列。

5、根据权利要求1的融合蛋白，其特征在于含有图1DVA序列相应的氨基酸序列。

6、一种白介素6—白介素2融合蛋白的制备方法，其特征在于：

(1) 白介素6功能区基因的克隆

(2) 中间接头与白介素2功能区基因的克隆

(3) 融合蛋白的表达载体p87220进行表达

(4) 大肠杆菌的高效表达融合蛋白

(5) 纯化，经分子筛凝胶过滤及高压液相而获得纯品

7、根据权利要求1的融合蛋白，可应用于免疫调节抗癌、抗淋巴瘤的药剂。

白介素6—白介素2融合蛋白及其制法和用途

本发明涉及一种具有功能蛋白的白介素6(11-6) —白介素2(11-2) 融合蛋白及其制法和用途，特别涉及具有免疫调节抗癌、淋巴瘤等功能的白介素6—白介素2融合蛋白及采用生物高技术制备方法。

以往研究表明，11-2是由T细胞分泌的一种细胞因子，具有广泛的免疫活性，临床应用可使25—30%的淋巴瘤、肾癌、黑色素瘤病员达到治愈或有效。结肠癌及非何杰金氏淋巴病也有较好疗效，而且可增强免疫力，提高抗H型肝炎病毒免疫力。11-6是继11-2等细胞因子后又一具有明显抗癌活性的生物免疫调节剂，属参与造血、免疫的多功能因子，其特点为抗肿瘤活性高，毒性作用小。新近实验证实，11-6可诱导的LAK活性也可直接作用于杀伤细胞，促进其功能分化。[Carzian RC, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987; 84: 7629] [Okada K et al, J. Immunol, 1989; 141: 1543] 这些都是11-2、11-6单因子在某些领域的研究，目前尚未见具有11-2—11-6融合蛋白的报道。

本发明的目的是提供一种白介素6—白介素2融合蛋白。

本发明的另一目的是提供一种采用生物高技术来制备白介素

6-白介素2融合蛋白的制备方法。

本发明的又一目的是提供采用白介素6-白介素2融合蛋白作为高效的抗癌药物。

本发明的目的是通过下述的方法实现的。

我们通过优化转译起始序列，合成11-6功能区上、下游引物，中间接头一对寡核苷酸，11-2下游引物，将天然终止密码子TAC换成大肠杆菌偏性密码子TAA，PCR扩增获得11-6，11-2功能区片段，经纯化后酶切，连接重组至表达载体PBV220，诱导表达、分离纯化包涵体，变性复性获得具有11-2、11-6双活性融合蛋白。

11-6-11-2融合蛋白较11-6、11-2单因子或双因子联合有更多生物学效应。

图1为11-6-11-2融合蛋白DNA序列图，碱基(bp)。

图2为融合蛋白表达载体构造图。其中1是PUC19-112，2是PBV220，3是PBV-112，4是PUC19-116，5是PBV-116112，6是112基因片段，7是11C基因片段。

下面结合附图对本实施例作详细说明。

图1，11-6-11-2融合蛋白由11-6序列(DNA序列1-540bp)中间接头(DNA序列541-585bp)11-2序列(586-990bp)接头15-45bp不等，可由甘、苏、丙、丝及天门冬酰胺组成，11-2，11

一b指与天然因子实质上一致，可与相应配基结合，转导生物信息引起生物活性，并可与相应抗体进行反应。

### 一、IL-6 功能区基因克隆。

利用Seqnce程序通过计算机分析确定转译的最佳起始区域，使其具有最小自由能，最佳碱基排列，避免可能干扰转译起始的RNA二级结构；确保两个引物之间，引物与模板之间具有最少的配对以避免扩增不必要的序列；在上游和下游引物中分别导入EcoRI和HdeI酶切位点加入起始密码子ATG。HdeI酶切位点是将IL-6 3'末端CAA ATG突变为CAT ATG而致。人工合成寡核苷酸引物：左侧(上游)引物5' CCG AAT TC ATG CAACAT TCC AAA CAT3'，右侧(下游)引物5' TAC ATA TCC CGA ACA CCC CTC3'。以IL-6 cDNA为模板，PCR扩增IL-6基因片段，获得约540bp产物，将上述片段经蛋白酶K消化处理后、酚/氯仿、乙醇沉淀萃取DNA经EcoRI酶切后与PUC19载体EcoRI, SmaI双酶切后重组，转化JM101受体菌，筛选白斑菌落，酶切鉴定获得阳性克隆PUC19-IL6。

### 二、中间接头与IL-2 功能区基因克隆。

我们将天然终止密码子TAG换成大肠杆菌偏性密码子TAA，中间接头为内侧12bp互补的一对寡核苷酸，其中3'端寡核苷酸17bp与IL-2 5'端互补。5'端寡核苷酸5' ATCAT ATG TCC C

GA GGC GGT TCT GGC GGT CCA GGT T3' , 3'端寡核苷酸5' AGGTCC ACT CCA GGC ACC TCC TCA ACC TCC ACC GC3'。IL-2功能区下游引物导入BamHI 酶切位点引物为5' CCC CA TCC TTA A TCA GGT CAG TGT3' 在最适条件下中间接头由一对寡核苷酸自身退火, 延伸产生, 利用5' 端寡核苷酸及IL-2下游引物, 以IL-2及中间接头为双模板, PCR基因重组获得约450bp IL-2及接头共同片段, 该片段上游含有NdeI 酶切位点, (图1 DNA序列535-540碱基(bp), 经纯化后BamHI 酶切与BamHI/SmaI 双酶切PUC19载体重组, 获得阳性克隆PUC19-IL2。

### 三、融合蛋白表达载体构造。

图2显示PBV220为表达载体, 由温度诱导抑制子基因CI857ts, PR与PL串联启动子, SD序列后面紧跟多克隆位点依次为EcoRI、PstI。将PUC19-IL2质粒纯化, EcoRI/BamHI双酶解消化, 回收1.1kb片段(在近EcoRI端含有NdeI至EcoRI小片段PUC多克隆基因区), 与BamHI/EcoRI双酶切CIP去磷酸化PBV220载体重组, 酶切鉴定获得PBV-IL2重组质粒。继而纯化该质粒, EcoRI及NdeI双酶切除去小片段, 将保留的载体及IL2片段与EcoRI/NdeI双酶切PUC19-IL6的IL-6功能区片段重组, 由此获得融合蛋白表达载体PBV-IL6-IL2。

#### 四、大肠杆菌高效表达融合蛋白。

将上述阳性克隆，制备过夜培养物，再以3%接种量种于含多种微量元素1,2培养基中，30℃振摇约1小时OD<sub>600</sub>达到0.4—0.6转移至42℃诱导1—6小时，常规收菌、裂解、SDS—PAGE电泳，用薄层扫描仪测得表达蛋白占菌体总蛋白32%，蛋白带的分子量为36—38KD，与理论计算分子量相符。融合蛋白氨基酸序列与图1011A序列相应氨基酸一致。

#### 五、活性测定。

将诱导细菌清洗后超声破碎10000rpm 4℃ 10' 离心后，4M脲素洗涤后，多种变性条件，7M盐酸胍变性(含DTT)25℃1小时在一定蛋白保护剂下还原型谷胱苷肽及氧化型谷胱苷肽复性，分别以11—6依赖小鼠杂交病细胞系7101及11—2依赖细胞株7111，测得116、11—2活性。

#### 六、纯化

在变性条件下将包涵体经分子筛凝胶过滤后，收集主峰复性后再经反相疏水柱纯化，获得95%左右的纯品。

本发明的优点是：

1、116—112融合蛋白的抗癌抗淋巴瘤效果比单独的116或112好。

2、本制备方法精确可靠，产品纯度高。

|     |             |            |            |
|-----|-------------|------------|------------|
| 1   | ATGGAACATT  | CCAAACATCT | ACCCCCCCCC |
| 31  | CACAGACAGC  | CACTCACCTC | TTACGAACGA |
| 61  | ATTGACAAAC  | AAATTCCGTA | CATCCTCCAC |
| 91  | CCCATCTCAG  | CCCTGACAAA | CCACACATCT |
| 121 | AACAAGACTA  | ACATCTGTCA | AACCAGCAAA |
| 151 | CAGGCCACTGC | CACAAAACAA | CCTGAACCTT |
| 181 | CCAAACATGG  | CTCAAAAAGA | TGGATCCTTC |
| 211 | CAATCTGGAT  | TCAATGAGCA | CAC TTCCTC |
| 241 | CTGAAAATCA  | TCACTGCTCT | TTTCGACTTT |
| 271 | CAGCTATACC  | TACAGTACCT | CCAGAACAGA |
| 301 | TTTGACAGTA  | GTGAGGAGCA | ACCCCAGCCT |
| 331 | GTCCAGATGA  | GTACAAAAGT | CCTCATCCAG |
| 361 | TTCTCTCCAG  | AAAAGGCCAA | GGTCTAGAT  |
| 391 | GCAATAAACA  | CCCCTCACCC | AACCAAGATT |
| 421 | GCCAGCCTGC  | TGACGAGGCT | CCAGCCACAG |
| 451 | AACCACTGCC  | TCCAGGACAT | GACAACTCAT |
| 481 | CTCATTTCTC  | GCAGCTTTAA | GCAGTTCTCG |
| 511 | CAGTCCAGCC  | TGAGCCCTCT | TCCGCATATC |

# 说明书附图

|     |             |             |             |
|-----|-------------|-------------|-------------|
| 541 | TCGGGAGGCG  | GTTGTGGGG   | TGGAGGTTCA  |
| 571 | GGAGGTGGGT  | CGAGTGGACCT | ACTTCAAGTT  |
| 602 | GTACAAAQAA  | AACACAGCTA  | CAACTGGAGC  |
| 632 | ATTTAATGCT  | GGATTTACAG  | ATGATTTTGA  |
| 662 | ATGGAATTAA  | CAATTACAAG  | AATCCCAAAAC |
| 692 | TCACCAAGGAT | GCTCACATTT  | AAGTTTTTACA |
| 722 | TGCCCCAAGAA | GGCCACAGAA  | CTGAAACATC  |
| 752 | TTCACTGTCT  | AGAAGAAGAA  | CTCAAAACCTC |
| 782 | TGGAGGAAGT  | GCTAAATTTA  | GCTCAAAAGCA |
| 812 | AAAACTTTCA  | CTTAAGACCC  | AGGGACTTAA  |
| 842 | TCAGCAATAT  | CAACGTAATA  | GTTCTGGAAC  |
| 872 | TAAAGGGATC  | TGAAACAACA  | TTCAATGTGTG |
| 902 | AATATGCTGA  | TGAGACAGCA  | AQCATTGTAG  |
| 932 | AATTTCTGAA  | CAGATGGATT  | ACCTTTTGTG  |
| 962 | AAAGCATCAT  | CTCAACACTG  | ACCTGATAA   |

图 1

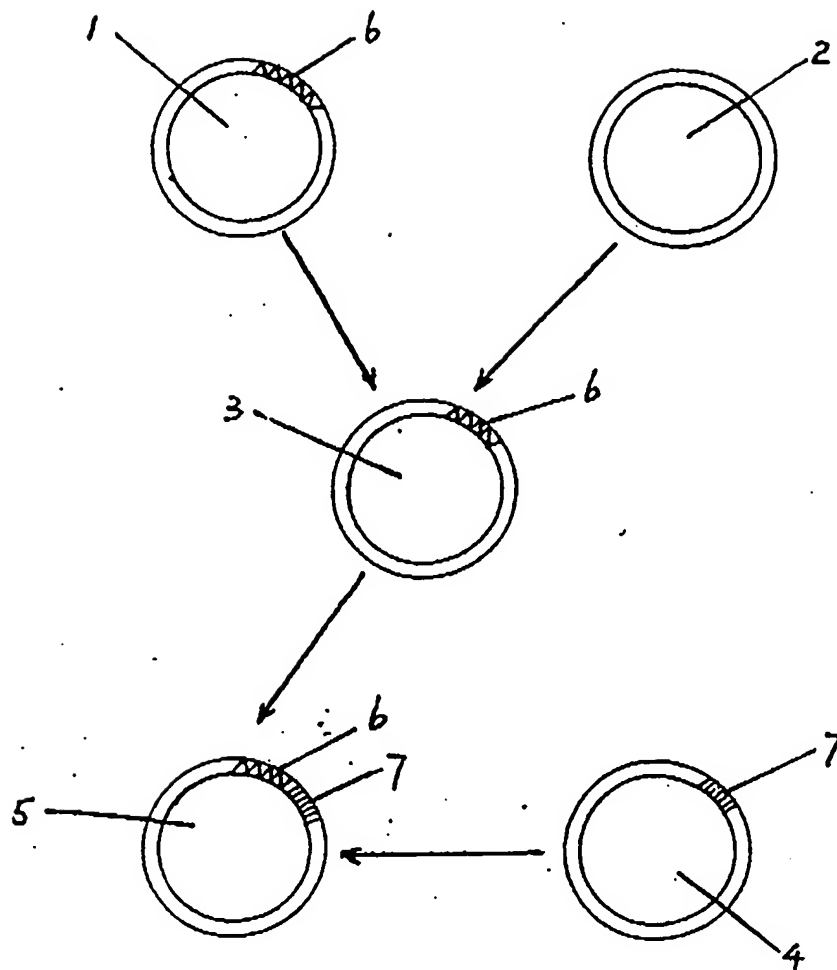


圖 2